



(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1831/94

(22) Anmeldetag: 26. 9.1994

(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.1995

(45) Ausgabetag: 25. 6.1996

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : C12Q 1/68  
C07H 21/00, C12N 15/00

(56) Entgegenhaltungen:

WO 9410342A1 WO 9322460A1 US 5213961A WO 9304199A2  
WO 9302215A1 GB 2187283A

(73) Patentinhaber:

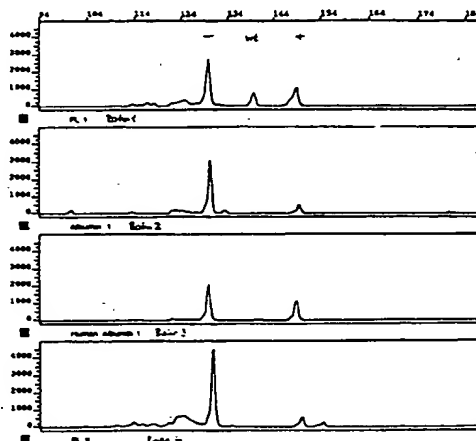
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

FALKNER FALKO-GÜNTHER DR.  
ORTH/DONAU, NIEDERÖSTERREICH (AT).  
HÄMMERLE THOMAS DR.  
ORTH/DONAU, NIEDERÖSTERREICH (AT).  
HIMMELSPACH MICHELE DR.  
WIEN (AT).  
KÖHL JOHANN DR.  
WIEN (AT).  
DÖRNER FRIEDRICH DR.  
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in einer Probe unter Anwendung von Nukleinsäure-Amplifizierung, wobei der Probe vor dem Amplifizierungsschritt eine gegebene Menge eines bekannten Nukleinsäuremoleküls als interner Standard zugegeben wird, welches Standard-Nukleinsäuremolekül sich von der zu quantifizierenden Nukleinsäure zumindest in einem detektierbaren Merkmal unterscheidet; zur Erzielung einer hohen Genauigkeit und guten Reproduzierbarkeit wird vorgesehen, daß der Probe vor der Nukleinsäure-Amplifizierung bekannte Mengen von mindestens zwei sich zumindest in einem detektierbaren Merkmal voneinander und von der zu quantifizierenden Nukleinsäure unterscheidenden bekannten Nukleinsäuremolekülen als interner Standard zugegeben werden, die erhaltenen Mengen an amplifizierter Proben- und Standard-Nukleinsäure bestimmt werden und aus den erhaltenen Mengen die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an zu quantifizierender Nukleinsäure bestimmt wird.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in einer Probe unter Anwendung von Nukleinsäure-Amplifizierung, wobei der Probe vor dem Amplifizierungsschritt eine gegebene Menge eines bekannten Nukleinsäuremoleküls als interner Standard zugegeben wird, welches Standard-Nukleinsäuremolekül sich von der zu quantifizierenden Nukleinsäure zumindest in einem detektierbaren Merkmal unterscheidet

Bekannt ist eine quantitative PCR Methode, die auf einer kompetitiven PCR-Reaktion beruht (Gilliland, PNAS 87 (1990), 2725). Zur Bestimmung von DNA-Mengen wird eine Verdünnungsreihe des internen Standard verwendet, die gleichzeitig mit der Probe amplifiziert wird. Die PCR-Reaktion wird bis zur Sättigung durchgeführt. Dies erlaubt auch die Detektion der PCR-Produkte mittels Ethidiumbromidfärbung. Die PCR-Produkte werden anschließend auf einem Gel aufgetrennt und die Kopienzahl der Probe mit der Kopienzahl der Standard-Verdünnungsreihe verglichen und so die Konzentration der Probe abgeschätzt. Diese Konzentrationsabschätzung ist dann exakt, wenn die Konzentration des Standards und der Probe etwa im Verhältnis 1:1 in einem Reaktionsgefäß amplifiziert wurden. Dies wiederum impliziert, daß die Bestimmung der DNA-Menge umso genauer erfolgt, je mehr Standardverdünnungen verwendet werden.

Eine Methode zur Quantifizierung von RNA wurde von Wang et al. (PNAS 86 (1989), 9717) vorgeschlagen. Diese PCR-Reaktion wird in der exponentiellen Phase gestoppt. Die Autoren schaffen sich durch Amplifikation unterschiedlicher Standardkonzentrationen eine Eichkurve. Da in der exponentiellen Reaktionsphase die Kopienzahl bzw. die Konzentration der RNA direkt proportional zur Anzahl der PCR-Zyklen steigt, ist diese Eichkurve eine Gerade, in der man schließlich die Konzentration einer amplifizierten Probe ablesen kann. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Endkonzentration der PCR-Produkte relativ gering ist, sodaß man für die Detektion empfindliche Nachweismethoden anwenden muß. Wang et al. benutzen radioaktiv markierte Nukleotide.

Eine Verbesserung in der Detektion von geringen Mengen an PCR-Produkten gelang Porcher et al. (BioTechnique 13 (1992), 106) durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten Primern und der Quantifizierung der PCR-Produkte mit einem automatischen Laser-Fluoreszenz-DNA-Sequencer.

Alle diese Methoden ermöglichen zwar die Quantifizierung bestimmter Gene, viraler DNA-Abschnitte oder mRNA, aber aufgrund unterschiedlicher Amplifizierung von Standard und Probe kommt es immer wieder zu falschen Ergebnissen; es ist auch bekannt, daß die Effizienz der PCR-Reaktion oftmals von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß unterschiedlich sein kann. Dieser Effizienzunterschied kann Unterschiede in den Ergebnissen von bis zu  $10^5$  ergeben. Die Reproduzierbarkeit der mit den bekannten Methoden erhaltenen Quantifizierungsdaten ist daher immer noch nicht ausreichend.

Die vorliegende Erfindung stellt sich die Aufgabe, ein Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, welches eine sehr genaue und vor allem eine gut reproduzierbare Information bezüglich der Menge an Nukleinsäure in einer Probe ermöglicht und gleichzeitig Aussagen über die Nachweisgrenze der zu bestimmenden Nukleinsäure erlaubt.

Das erfindungsgemäße Verfahren der eingangs erwähnten Art ist dadurch gekennzeichnet, daß der Probe vor der Nukleinsäure-Amplifizierung bekannte Mengen von mindestens zwei sich zumindest in einem detektierbaren Merkmal voneinander und von der zu quantifizierenden Nukleinsäure unterscheidenden bekannten Nukleinsäuremolekülen als interner Standard zugegeben werden, die erhaltenen Mengen an amplifizierter Proben- und Standard-Nukleinsäure bestimmt werden und aus den erhaltenen Mengen die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an zu quantifizierender Nukleinsäure bestimmt wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht überraschenderweise eine sehr exakte und darüberhinaus gut reproduzierbare Quantifizierung von Nukleinsäuren aller Art.

Unter Nukleinsäure-Amplifizierung sind prinzipiell Verfahren zu verstehen, welche auf der von Mullis et al. (U.S. PS 4,683,195 und 4,683,202) entwickelten Technologie beruhen, beispielsweise die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) oder die Ligase-PCR (LCR).

Die Standard-Nukleinsäure muß sich in wenigstens einem detektierbaren Merkmal von der zu quantifizierenden Nukleinsäure unterscheiden, sie sollte aber mit Hilfe der gleichen Primer amplifiziert werden können. Als praktisch haben sich Standard-Nukleinsäuren erwiesen, die eine andere Größe als die zu quantifizierende Nukleinsäure oder eine unique Restriktionsschnittstelle aufweisen. Die Standard-Nukleinsäure ist bei Bestimmung von DNA-Mengen vorzugsweise eine DNA und bei Bestimmung von RNA-Mengen vorzugsweise eine RNA. Bevorzugte Standards unterscheiden sich von der zu quantifizierenden Nukleinsäure in 1 % bis 20 % ihrer Länge bzw. durch mindestens 3, maximal 50 Nukleotide, wobei eine Standardnukleinsäure, die länger ist als die zu bestimmende Nukleinsäure, als "plus" ("+"-Standard bezeichnet wird, und eine Standardnukleinsäure, die kleiner ist als die zu bestimmende Nukleinsäure, als "minus" ("-"-Standard bezeichnet wird. Die genaue Sequenz der Standard-Nukleinsäure sollte natürlich bekannt sein.

Die Standards werden im erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugt in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt, wobei einer der Standards in einer Konzentration knapp oberhalb der Nachweisgrenze zugege-

ben wird.

Die beim Amplifizieren verwendeten Primer enthalten vorzugsweise Gruppen, welche die Nachweisgrenze der amplifizierten Nukleinsäuren erhöhen, beispielsweise fluoreszierende oder radioaktive Gruppen oder chemische Gruppen, die mit affinen Proteinen und nachgestalteten Detektionsreaktionen detektiert werden können (z.B. Biotin-Avidin, DIG-Markierung, etc.), wobei Primer mit fluoreszierenden Gruppen besonders bevorzugt sind.

Die Bestimmung der Nukleinsäure-Mengen (unter Nukleinsäure-Menge versteht man prinzipiell die Quantität an DNA oder RNA; eine Nukleinsäure-Menge kann z.B. in Form von Masse (mg, µg, ng, pg, ...) oder als Anzahl der Kopien eines bestimmten Nukleinsäure-Moleküls angegeben werden) nach der Amplifizierung kann auf unterschiedlichste Art erfolgen, meist jedoch ist ein Schritt vorzusehen, bei welchem die amplifizierte Standard-Nukleinsäure von der amplifizierten, zu quantifizierenden Nukleinsäure getrennt wird und die getrennten Nukleinsäure-Mengen separat bestimmt werden. Vorzugsweise besteht dieser Trennungsschritt in einer Gelelektrophorese oder in einem chromatographischen Verfahren.

Als besonders geeignet haben sich Detektionsverfahren erwiesen, welche automatisch erfolgen und den Trennungs- und Quantifizierungsschritt kombinieren. Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht daher darin, daß die Bestimmung der Mengen an amplifizierter Nukleinsäure unter Verwendung eines Nukleinsäure-Detektionsgerätes, vorzugsweise eines fluoreszenz-empfindlichen Nukleinsäure-Detektionsgerätes, erfolgt. Beispiele für solche Nukleinsäure-Detektionsgeräte sind automatische DNA-Sequencer mit laserinduzierten Fluoreszenz-Meßeinrichtungen (z.B. Gene Scanner®373A der Firma Applied Biosystems) oder HPLC-Anlagen. Bei diesen Geräten ist es möglich, Nukleinsäure-Moleküle voneinander zu trennen, die sich lediglich um ein bp in der Länge unterscheiden.

Ein besonderer Vorteil des Gene Scanner® ist es, unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe in einer einzigen Spur unterscheiden zu können. Dies ermöglicht die gleichzeitige Aufarbeitung einer Vielzahl von Proben auf einem Gel, da alle am Gel zur Verfügung stehenden Spuren für Proben verwendet werden können. Weiters ist es möglich, eine Vielzahl von PCR-Produkten, markiert mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen, in einer einzigen Bahn zu analysieren (Multiplex-PCR). Beim gleichzeitigen Nachweis von beispielsweise zwei verschiedenen Nukleinsäuren in einer Probe werden außerdem Aufwand und Kosten nahezu halbiert. Dies ist beim Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens im Routinebetrieb von besonderem Vorteil, wenn beispielsweise eine Blutprobe auf HIV und HBV getestet werden soll. Im Gegensatz dazu kann der von Porcher et al. zur Analyse der PCR-Produkte verwendete automatische Laser-Fluoreszenz-DNA-Sequencer nur einen Fluoreszenzfarbstoff (und damit nur eine DNA) pro Spur analysieren.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft daher ein Verfahren, bei dem mehrere erhaltene Mengen an amplifizierter Proben- und Standard-Nukleinsäuren in der gleichen Probe mittels der Multiplex-Analyse bestimmt werden.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Amplifizierungsschritt bereits in der exponentiellen Phase gestoppt.

Dadurch wird erreicht, daß das Verhältnis der Kopienanzahl der amplifizierten Standards direkt proportional zur Kopienanzahl der zu quantifizierenden Sequenz ist. Weiters kann durch Koamplifikation eines einzigen Standards die Kopienanzahl der zu bestimmenden Nukleinsäure festgestellt werden. In diesem Punkt ist die erfindungsgemäße Methode der oft verwendeten Methode von Gilliland et al weit überlegen, da pro Probe lediglich eine Messung mit wenigstens zwei verschiedenen Standard-Molekülen durchgeführt werden muß, wogegen die Methode nach Gilliland um so genauer wird, je mehr Standards in verschiedenen Verdünnungen in verschiedenen Proben verwendet werden.

Ein besonders bevorzugtes Anwendungsgebiet des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Quantifizierung viraler Nukleinsäuren, vorzugsweise Nukleinsäuren aus HIV, Parvovirus, Herpesvirus, HAV, HBV, HCV, Baculovirus, Adenovirus oder Vacciniavirus. Diese Viren sind sowohl als Pathogene als auch wegen ihrer Verwendung in der Herstellung von Impfstoffen und rekombinanten Proteinen interessant.

Es werden vorzugsweise virale Nukleinsäuren in einer biologischen Probe, insbesondere in humanen Plasmen und deren Derivaten, gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren quantifiziert. Beispielsweise kann mit der vorliegenden Methodik der Verlauf einer Infektion oder die Überwachung von Impfungs- bzw. Therapiebehandlungen besser und genauer überwacht werden.

Dabei ist es von besonderer Bedeutung, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren pathogene Viren in einer Konzentration bestimmt werden können, die mindestens eine Zehnerpotenz unterhalb der infektiösen Dosis diese Viren liegt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Bestimmung der Nachweisgrenze von bestimmten Nukleinsäuren, bei welchem mindestens eine Standard-Nukleinsäure mit einer Konzentration von knapp oberhalb der Nachweisgrenze eingesetzt wird.

Vorzugsweise wird die Menge an Nukleinsäure in pg/ml nach der folgenden Formel berechnet:

$$m_{\text{Probe}} = A_{\text{Probe}} / A_{\text{Standard}} \cdot N_{\text{Standard}} \cdot F \cdot D$$

5 worin

$A_{\text{Probe}}$  die Peak-Fläche der amplifizierten Nukleinsäuren der Probe,

$A_{\text{Standard}}$  der Mittelwert, der aus der Peak-Fläche der amplifizierten internen Standards resultiert,

$N_{\text{Standard}}$  der errechnete Mittelwert der eingesetzten Kopien des internen Standards,

F das Verhältnis des Volumens des Standards zum extrahierten Volumen und

10 D der Verdünnungsfaktor (falls die Probe vor der Extraktion verdünnt worden ist).

Da nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mindestens zwei Standards in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden, erhält man nach der oben beschriebenen Berechnung mindestens zwei Werte für die Konzentration der Probe, aus denen man schließlich den Mittelwert berechnet. Im Routinebetrieb werden von jeder Probe in der Regel zwei Ansätze mit jeweils zwei Primern und mindestens zwei

15 Standards analysiert, wodurch schließlich ein Mittelwert aus vier Werten für die Konzentration der Probe gebildet werden kann.

Die Reproduzierbarkeit der erfindungsgemäßen Methode beträgt 95%. Um dies zu erreichen, muß darauf geachtet werden, daß die Effizienz der PCR-Reaktion für den Standard und die Probe gleich groß ist. Die Effizienz der PCR-Reaktion ist vor allem dann von Bedeutung, wenn die PCR-Reaktion wie bei der

20 bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung in der exponentiellen Phase gestoppt wird. Im Sättigungsbereich fällt eine unterschiedliche Effizienz für Standard und Probe nicht so sehr ins Gewicht.

Beeinflußt wird die Effizienz der PCR-Reaktion zum Beispiel von der Art des zu amplifizierenden Nukleinsäure-Moleküls. Wird die erfindungsgemäße Methode zur Bestimmung von RNA-Viren herangezogen, so kämpft man mit dem allgemein bekannten Problem, daß die reverse Transkription nur unvollständig

25 ist und lediglich wenige Prozent der vorhandenen RNA auch wirklich transkribiert werden. Weiters hat sich gezeigt, daß die Effizienz für den + bzw. - Standard nicht unbedingt gleich ist. Dadurch kommt es zu Schwankungen in den zu bestimmenden Konzentrationen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden daher zur Vergrößerung der erhaltenen Information unterschiedliche Mengen der mindestens zwei Standard-Nukleinsäuren der Probe vor der

30 Amplifizierung zugegeben werden. Ein bevorzugtes Verhältnis der Standards ist ein Verhältnis von 1:3. Bei der oben erwähnten RNA-Analyse schwanken zwar die erhaltenen Verhältnisse zwischen 1:1 und 1:6, aus den Ergebnissen vieler Versuche und vor allem unter Verwendung des vorliegenden Verfahrens kann aber gezeigt werden, daß im Mittel ein Verhältnis der internen Standards von rund 1:3 evaluiert werden kann.

35 Um weitere Ungenauigkeit in der Konzentrationsbestimmung der Probe auszuschließen, werden daher im Routineverfahren zwei Aliquote jeder Probe bestimmt, bei denen jeweils mindestens zwei Standards mitamplifiziert werden. So erhält man vier Meßwerte pro Probe, aus denen man sich dann einen Mittelwert errechnen kann. In den Beispielen ist die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode gut demonstriert. Es wird auch gezeigt, daß die Methode über einen großen Konzentrationsbereich reproduzierbare

40 Ergebnisse liefert. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kommen zwei Standard-Nukleinsäuren zum Einsatz, welche eine gegenüber der zu quantifizierenden Nukleinsäure unterschiedliche Länge aufweisen, vorzugsweise eine Standard-Nukleinsäuresequenz, welche kürzer, und eine Standard-Nukleinsäuresequenz, welche länger ist als die zu quantifizierende Nukleinsäure. Ein besonders

45 bevorzugter Längenunterschied liegt zwischen 1 % und 20 %. Es hat sich für die erfindungsgemäße Methode von Vorteil erwiesen, die Nukleinsäure der internen Standards in linearisierter Form der PCR-Reaktion zuzusetzen. Dadurch werden weitere Unterschiede in der Effizienz der Reaktion ausgeglichen, die auf die unterschiedliche Form der zu amplifizierenden Nukleinsäure zurückzuführen sind.

50 Wichtige Kriterien bei der Quantifizierung von Nukleinsäuren sind - wie erwähnt - die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäure-Mengen im Bereich von 1 bis 100 pg wesentlich präziser und reproduzierbarer als mit den im Stand der Technik beschriebenen Methoden bestimmt werden. Damit ist aber keineswegs die Sensitivitätsgrenze der Methode erreicht

Das Verwendungsspektrum des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt beispielsweise die qualitative

55 und quantitative Analyse von biologischen Proben auf Nukleinsäuren, insbesondere Blut und Blutderivate und biotechnologische Produkte. Eine weitere beispielhafte Einsatzmöglichkeit liegt in der Diagnose und/oder der Überwachung des Verlaufes von Infektionen sowie in der Überwachung von Impf- und Therapiebehandlungen.

Ein wichtiger Aspekt der Erfindung betrifft daher biologische, insbesondere biotechnologische Produkte, die zumindest einen unterhalb der erlaubten Grenzen von 10 bzw. 100 pg pro Dosis und mit dem vorliegenden Verfahren gemessenen Gehalt an Nukleinsäuren aufweisen und damit als im wesentlichen frei von Nukleinsäuren gelten können.

Zu den bevorzugten Produkten gehören virale Proteine, wie gp160, rekombinante Blutfaktoren, Plasma-proteine, sowie Impfstoffe, insbesondere gegen Herpes-, Influenza- oder TBE-Viren, und monoklonale Antikörper.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung des erfindungs-gemäßen Verfahrens zur Detektion von Nukleinsäuren in biologischen Proben.

Im weiteren kämpft die Qualitätskontrolle insbesondere bei Impfstoffen oder biotechnologisch erzeugten Proteinen mit Background-Problemen. So kann man beim Bestimmen von kontaminierender Nukleinsäure (chromosomale DNA, RNA, virale DNA und RNA) bei Primaten-Zellkulturen auch die Verunreinigungen durch die Handhabung während der Produktion oder während der Aufarbeitung der Produkte durch das erfindungsgemäße Verfahren erfassen, wenn die eingesetzten Primer spezifisch sind. Erfolgt die Produktion von rekombinanten Proteinen allerdings in Nicht-Primaten-Zellkulturen, wie zum Beispiel CHO (Chinese Hamster Ovarien), BHK (Baby Hamster Nierenzellen) oder CEC (Hühner-Embryozellen), so ist die Nach-weisgrenze mit der erfindungsgemäßen Methode weit niedriger, da das Problem der Verunreinigungen durch die Handhabung der Probe wegfällt. Besonders bevorzugt wird die erfindungsgemäße Quantifizie-rungsmethodik bei Nukleinsäuren aus CHO-, Vero-(Affenzelllinie), BHK-, SK-Hep1-(menschliche Leberzelli-nie), Hybridom- oder CEC-Zellen angewendet, da diese Zellkulturen am gebräuchlichsten sind bei der Produktion von Impfstoffen oder biotechnologisch hergestellten Proteinen.

Die Auswahl der Primerpaare ist selbstverständlich ebenfalls ein wichtiger Faktor, um eine gute Quantifizierung zu erhalten. Daher betrifft die vorliegende Erfindung gemäß einem weiteren Aspekt Primer, welche im vorliegenden Verfahren zur Anwendung kommen, nämlich

HAV + 2058:ACTGCCATTGGGAAGCTTATTGTG	HAV 2058-2081	Seq.ID 3,
HAV-2172:CATCCATAGCATGATAAAGAGGAGC (Numerierung nach Cohen et al. (J.Virol.61 (1987) 50-59)	HAV 2196-2172	Seq.ID 4, ..
HCV32: CTGTGAGGAACTACTGTCTT	HCV 45-64	Seq.ID 5,
HCVPT4: CGGTTCCGCAGACCACTATG (Numerierung nach Han et al. (PNAS 88 (1991) 1711-1715)	HCV 158-139	Seq ID 6,
HBV + 1780B:CATTGATCCTTATAAAGAATTTGGAGC	HBV 1780-1806	Seq.ID 7 und
HBV-1950B:CCAGCAGAGAATTGCTTGCCTGAG (Numerierung nach Fujiyama et al. (Nucleic Acids Res.11 (1983) 4601-4610)	HBV 1973-1950	Seq.ID 8

und Plasmide für die Herstellung der Standards, nämlich

pgag1 (bestehend aus dem bekannten pBS/SK<sup>-</sup>-Plasmid und einem Insert zwischen der Pst I und der Apa I Stelle der multiplen Klonierungsstelle, welches Insert die Basenpaare (bp) 1417 bis 2008 der HIV-1 Sequenz aus Ratner et al. (Nature 313 (1985), 277-284) enthält),

pgag-15 (abgeleitet aus pgag1 mit einer Deletion von 15 bp ab bp 1593 der HIV-1 Sequenz aus Ratner et al.),

pgag + 12 (abgeleitet aus pgag1, indem eine 12 Nukleotide lange Insertion an der bp1593-Stelle eingefügt wurde),

pHAV-wt (bestehend aus dem bekannten pCRII-Plasmid) und einem Insert an der multiplen Klonierungsstel-le des pCRII-Plasmids, welches Insert die bp 2020 bis 2226 der cDNA-Sequenz aus Cohen et al. enthält),

pHAV-10bp (abgeleitet aus pHAV-wt mit einer Deletion von 10 bp ab bp 2100 der HAV-Sequenz aus Cohen et al. eingefügt wurde),

pHAV + 9bp (abgeleitet aus pHAV-wt, indem eine 9 Nukleotide lange Insertion an der bp2100-Stelle eingefügt wurde),

pHCV-wt (bestehend aus dem bekannten pBS/SK<sup>-</sup>-Plasmid und einem Insert an der EcoRV-Stelle diese Plasmids, welches Insert die bp 27 bis 313 der cDNA-Sequenz aus Han et al. enthält),

pHCV-7bp (abgeleitet aus pHCV-wt mit einer Deletion von 7bp ab bp 126 der HCV-Sequenz aus Han et al. eingefügt wurde),

pHCV + 8bp (abgeleitet aus pHCV-wt, indem eine 8 Nukleotide lange Insertion an der bp126-Stelle eingefügt wurde),

pHBV-wt (bestehend aus dem bekannten pBluescript II SK<sup>±</sup>-Plasmid und einem Insert an der EcoRI-Stelle diese Plasmids, welches Insert die bp 1763 bis 2032 des HBV-Genoms gemäß Fujiyama et al. enthält),

pHBV-9bp (abgeleitet aus pHBV-wt mit einer Deletion von 9bp ab bp 1868 der HBV-Sequenz aus Fujiyama et al. eingefügt wurde) und pHBV+12bp (abgeleitet aus pHBV-wt, indem eine 12 Nukleotide lange Insertion an der bp1868-Stelle eingefügt wurde).

- Die Erfindung wird in den nachstehenden Beispielen und den dazugehörigen Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert. Insbesondere wird in den Beispielen gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren sich hervorragend für eine routinemäßige, schnelle und trotzdem genaue und reproduzierbare Quantifizierung von Nukleinsäuren in unterschiedlichsten Proben eignet. Es zeigen: Fig.1 die Klonierung von pgag-15 und pgag+12; Fig.2 die Ergebnisse der Quantifizierung von HAV mit RT-PCR; Fig.3 die Ergebnisse der Quantifizierung von HBV; und Fig.4 ist das Sequenzprotokoll.

## Beispiele

### 1. Allgemeine Arbeitsvorschriften:

#### 1.1. Prinzip des Verfahrens

Nukleinsäuren unterschiedlicher Herkunft werden mittels PCR unter Verwendung von Primern, welche fluoreszierende Gruppen haben, amplifiziert (Saiki et al., Science 239 (1985) 487-491). Die Analyse und die Quantifizierung der erhaltenen amplifizierten PCR-Produkte wurde mit Hilfe eines automatischen DNA-Sequenzierers mit laserinduzierter Fluoreszenz-Meßeinrichtung (DNA-Sequenzierer 373A mit Gene Scan®-Software von Applied Biosystems) ausgeführt. Dieses Instrument ist in der Lage, die Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte mittels einer Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufzutrennen und deren Menge quantitativ zu bestimmen. Die Kopienzahl bestimmter Sequenzen in der Probe wird auf Grundlage der erhaltenen Intensitäten der PCR-Produkte von zu quantifizierender Nukleinsäure und mindestens zwei internen Standards bestimmt.

#### 1.2.1. Extraktion viraler DNA

500 µl der Probe werden für 20 min bei 70000 rpm in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl 10 mM TRIS/HCl pH 8,0 und 10 µl Proteinase K (Boehringer Mannheim, 20 mg/ml), sowie 10 µl 20% SDS aufgelöst. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C oder für 4 h bei 56°C wird eine bestimmte Menge an Standard-Nukleinsäure zugesetzt, die Probe nacheinander mit Phenol und Chloroform extrahiert und 10 µl Glykogen (Boehringer Mannheim, 20 mg/ml) zugesetzt. Anschließend wird mit Ethanol präzipitiert, zentrifugiert, das Pellet gewaschen und schließlich in Wasser wieder gelöst.

#### 1.2.2. Extraktion proviraler DNA

5 x 10<sup>5</sup> Zellen werden in 100 µl Lysis-Puffer (1 X PCR-Puffer von Boehringer, 0,5 mg/ml Proteinase K, 0,45 % Tween) 5 h bei 56°C lysiert. Aliquote davon werden für die PCR eingesetzt.

#### 1.2.3. Extraktion von RNA

1 ml Plasma bzw. mit PBS verdünntes Plasma wird bei 100000 rpm 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wird durch Absaugen entfernt. Das Pellet wird in 1 ml Guanidiniumisothiocyanat-Lösung (RNAzol® der Firma Biotecx) aufgenommen und 5 µl 1 mg/ml t-RNA aus Hefe und 20 µl Standard-RNA zugegeben. Es werden 400 und 1200 Kopien des Minus- und Plus-RNA-Standards zugegeben und gevortext. Die Lösung wird 10 min bei 70°C erhitzt, dann 1/10 Volumen Chloroform zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wird für 5 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand in neue Röhrchen transferiert. 500 µl Isopropanol wird zugegeben und 15 min auf -80°C gestellt. Anschließend wird 10 min zentrifugiert, 2 X mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet in 25 µl Wasser aufgenommen. Für die RT-PCR-Reaktion werden 5 µl eingesetzt.

### 1.3. PCR

Der PCR-Ansatz enthält in bekannter Weise ein Aliquot der extrahierten Nukleinsäure, PCR-Puffer (Boehringer Mannheim), MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer, Taq-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim, 5,0 E/µl) und



Wasser. Die PCR wird gemäß den Angaben des Herstellers von Puffer und Enzym bzw. gemäß üblicher Arbeitsvorschriften (Mullis et al., *Methods in Enzymology* 155 (1987), 335) in einer PCR-Apparatur (GeneAmp PCR System 9600 der Firma Perkin-Elmer) durchgeführt.

#### 5 1.4. Analyse der Produkte

Für die Bestimmung und Quantifizierung der PCR-Produkte werden der PCR-Lösung 0,5 bis 1,0 µl entnommen und in einem 373A Instrument der Firma Applied Biosystems gemäß den Angaben des Herstellers analysiert.

#### 10 2. Beispiel 1: Quantifizierung von HIV durch reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Bei dieser Quantifizierung werden Primer verwendet, welche in den cDNA-Sequenzen des HIV-1 binden und durch RT-PCR von Wildtyp-RNA ein 115 bp großes Produkt ergeben, nämlich

15 SK38: ATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAAT HIV-1 1551-1578 Seq.ID 1

SK39: TTTGGTCCTTGCTTATGTCCAGAATGC HIV-1 1665-1638 Seq.ID 2

(Numerierung nach Ratner et al.). Die Primer wurden unter Verwendung der Phosphoramidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer hergestellt (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer).

Die Standard-Plasmide pgag-15 und pgag + 12 sind abgeleitet aus dem Plasmid pgag1, welches aus dem bekannten pBS/SK<sup>-</sup>-Plasmid (Firma Stratagene) und einem Insert in der multiplen Klonierungsstelle dieses Plasmids besteht, welches Insert die bp 1417 bis 2008 des HIV-1 aus Ratner et al. enthält.

In pgag-15 wurden die bp 1593 bis 1607 deletiert, in pgag + 12 ein 12 bp langes Insert an der Stelle 1593 eingefügt (siehe Fig.1). Die Plasmide wurden gereinigt (QUIAGEN-Verfahren), die Konzentration durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, mit EcoRI geschnitten und in einem 10mM TRIS/HCl pH 8/0,1 mM EDTA-Puffer verdünnt (Sambrook et al. *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor (1989)).

In vitro Transkription mit T3-Polymerase gemäß Sambrook et al. ergibt ein 644 " + "Transkript und ein 617 b " - "Transkript, welche mit einer Guanidinisothiocyanatlösung extrahiert und durch spektrophotometrische Messungen bei 260 nm quantifiziert werden.

30 Diese RNA-Präparationen dienen als Standard für die RT-PCR.

Die Länge der RT-PCR-Produkte von Standard und Wildtyp-DNA betragen daher 127 (pgag + 12), 100 (pgag-15) und 115 bp (wt).

#### 3. Beispiel 2: Quantifizierung von HAV durch RT-PCR

Bei dieser Quantifizierung werden Primer verwendet, welche in den cDNA-Sequenzen des HAV binden und durch RT-PCR von Wildtyp-RNA ein 139 bp großes Produkt ergeben, nämlich

HAV + 2058: ACTGCCATTGGGAAGCTTATTGTG HAV 2058-2081 Seq.ID 3 und

HAV-2172: CATCCATAGCATGATAAAGAGGAGC HAV 2196-2172 Seq.ID 4

40 (Numerierung nach Cohen et al. (*J.Virol.* 61 (1987) 50-59). Die Primer wurden unter Verwendung der Phosphoramidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer hergestellt (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer).

Die Standard-Plasmide pHAV-10 und pHAV + 9 sind abgeleitet aus dem Plasmid pHAV-wt, welches aus dem bekannten pCR11-Plasmid (Firma InVitrogen) und einem Insert in der multiplen Klonierungsstelle dieses Plasmids besteht, welches Insert die bp 2020 bis 2226 des HAV aus Cohen et al. enthält.

45 In pHAV-10 wurden die bp 2100 bis 2109 deletiert, in pHAV + 9 ein 9 bp langes Insert an der Stelle 2100 eingefügt. Die Plasmide wurden gereinigt (QUIAGEN-Verfahren), die Konzentration durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, mit AlwNI geschnitten und in einem 10mM TRIS/HCl pH 8/0,1 mM EDTA-Puffer verdünnt (Sambrook et al. *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor (1989)).

50 In vitro Transkription mit T3-Polymerase gemäß Sambrook et al. ergibt ein 1140 b " + "Transkript, ein 1121 b " - "Transkript und ein 1131 b "wt"Transkript, welche mit einer Guanidinisothiocyanatlösung extrahiert und durch spektrophotometrische Messungen bei 260 nm quantifiziert werden.

Diese RNA-Präparationen dienen als Standard für die RT-PCR.

Die Länge der RT-PCR-Produkte von Standard und Wildtyp-DNA betragen 148 (pHAV + 9), 129 (pHAV-10) und 139 bp (wt).

55 Zwei Plasmen (PL1 und PL2) sowie zwei Albuminlösungen (Albumin und Humanalbumin) wurden mittels der beschriebenen Methode auf HAV untersucht. Tabelle 1 zeigt die Auswertung der Messungen mit dem Nukleinsäure-Detektionsgerät mit Hilfe eines Computerprogrammes (MS Excel®). Spalten 1 und 2

geben die Menge an eingesetzten Minus-Standard und Plus-Standard an. Spalten 3 und 4 bezeichnen Verdünnung und eingesetztes Volumen. In Spalte 5 ist die Probe angegeben, Spalte 6 bezeichnet das Virus, auf das untersucht wird. Die Kopienzahlen der Proben wurden sowohl anhand des Minus-Standards (N-Base; Spalte 7) als auch anhand des Plus-Standards (N+Base; Spalte 8) berechnet; der Mittelwert beider Bestimmungen ergibt das Meßergebnis. Spalte 9 blieb leer. Spalte 10 gibt die Nummer des Probenlaufes an. Die Spalten 11, 12 und 13 geben die Fläche der detektierten Peaks an.

Fig.2 zeigt die graphische Auswertung der HAV-Untersuchung, wobei in den verschiedenen Bahnen die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der PCR-Produkte (und Nebenprodukte) dargestellt. Die Produkte sind anhand ihrer definierten Größe (in bp) identifizierbar. Die Standards sind 148 und 129 bp lang, der Wildtyp 139.

15

20

25

30

35

40

45

50

55



600

[illegible]

55

## 4. Beispiel 3: Quantifizierung von HCV durch RT-PCR

Bei dieser Quantifizierung werden Primer verwendet, welche in den cDNA-Sequenzen des HCV binden und durch RT-PCR von Wildtyp-RNA ein 114 bp großes Produkt ergeben, nämlich

- 5 HCV32: CTGTGAGGAACTACTGTCTT HCV 45-64 Seq.ID 5 und  
HCVPT4: CGGTTCCGCAGACCACTATG HCV 158-139 Seq ID 6

(Numerierung nach Han et al. (PNAS 88 (1991) 1711-1715). Die Primer wurden unter Verwendung der Phosphoamidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer hergestellt (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer).

- 10 Die Standard-Plasmide pHCV-7 und pHCV + 8 sind abgeleitet aus dem Plasmid pHCV-wt, welches aus dem bekannten pBS/SK<sup>-</sup>-Plasmid (Firma Statagene) und einem Insert in der multiplen Klonierungsstelle dieses Plasmids besteht, welches Insert die bp 27 bis 313 des HCV aus Han et al. enthält.

- In pHCV-7 wurden die bp 126 bis 135 deletiert, in pHCV + 8 ein 8 bp langes Insert an der Stelle 126 eingefügt. Die Plasmide wurde gereinigt (QUIAGEN-Verfahren), die Konzentration durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, mit XmnI geschnitten und in einem 10mM TRIS/HCl pH 8/0,1 mM EDTA-Puffer verdünnt (Sambrook et al. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor (1989)).

In vitro Transkription mit T3-Polymerase gemäß Sambrook et al. ergibt ein 1385 b " + "Transkript, ein 1370 b " - "Transkript und ein 1377 b " wt "Transkript, welche mit einer Guanidinisothiocyanatlösung extrahiert und durch spektrophotometrische Messungen bei 260 nm quantifiziert werden.

- 20 Diese RNA-Präparationen dienen als Standard für die RT-PCR.

Die Länge der RT-PCR-Produkte von Standard und Wildtyp-DNA betragen daher 122 (pHCV + 8), 107 (pHCV-7) und 114 bp (wt).

## 5. Beispiel 4: Quantifizierung von HIV-proviraler DNA

25

Bei dieser Quantifizierung werden Primer verwendet, welche in den cDNA-Sequenzen des HIV-1 binden und durch PCR von proviraler HIV-DNA ein 115 bp großes Produkt ergeben, nämlich

SK38: ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT HIV-1 1551-1578 Seq.ID 1

SK39: TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC HIV-1 1665-1638 Seq.ID 2

- 30 (Numerierung nach Ratner et al.). Die Primer wurden unter Verwendung der Phosphoamidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer hergestellt (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer).

Die Standard-Plasmide pgag-15 und pgag + 12 sind abgeleitet aus dem Plasmid pgag1, welches aus dem bekannten pBS/SK<sup>-</sup>-Plasmid (Firma Stratagene) und einem Insert in der multiplen Klonierungsstelle dieses Plasmids besteht, welches Insert die bp 1417 bis 2008 der HIV-1 aus Ratner et al enthält.

- 35 In pgag-15 wurden die bp 1593 bis 1607 deletiert, in pgag + 12 ein 12 bp langes Insert an der Stelle 1593 eingefügt (siehe Fig.1). Die Plasmide wurde gereinigt (QUIAGEN-Verfahren), die Konzentration durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, mit EcoRI geschnitten und in einem 10mM TRIS/HCl pH 8/0,1 mM EDTA-Puffer verdünnt (Sambrook et al. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor (1989)).

- 40 Diese DNA-Präparationen dienen als Standard für die PCR.

Die Länge der PCR-Produkte von Standard und Wildtyp-DNA betragen daher 127 (pgag + 12), 100 (pgag-15) und 115 bp (wt).

## 6. Beispiel 5: Quantifizierung von HBV

45

Bei dieser Quantifizierung werden Primer verwendet, welche im Genom des HBV binden und durch PCR von Wildtyp-DNA ein 182 bp großes Produkt ergeben, nämlich

HBV + 1780B: CATTGATCCTTATAAAGAATTTGGAGC HBV 1780-1806 Seq.ID 7 und

HBV-1950B: CCAGCAGAGAATTGCTTGCTGAG HBV 1973-1950 Seq.ID 8

- 50 (Numerierung nach Fujiyama et al.). Die Primer wurden unter Verwendung der Phosphoamidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer hergestellt (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer).

Die Standard-Plasmide pHBV-9 und pHBV + 12 sind abgeleitet aus dem Plasmid pHBV-wt, welches aus dem bekannten pBluescript II SK<sup>±</sup>-Plasmid (Firma Stratagene) und einem Insert in der multiplen Klonierungsstelle dieses Plasmids besteht, welches Insert die bp 1763 bis 1868 der HBV aus Fujiyama et al. enthält.

55

In pHBV-9 wurden die bp 1868 bis 1876 deletiert, in pHBV + 12 ein 12 bp langes Insert an der Stelle 1858 eingefügt. Die Plasmide wurden gereinigt (QUIAGEN-Verfahren), die Konzentration durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, mit einem Restriktionsenzym einmal geschnitten und in einem

10mM TRIS/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA-Puffer verdünnt (Sambrook et al. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor (1989)).

Diese DNA-Präparationen dienen als Standard für die PCR.

Die Länge der PCR-Produkte von Standard und Wildtyp-DNA betragen daher 194 (pHBV + 12), 173 (pHBV-9) und 182 bp (wt).

Die Ergebnisse einer Quantifizierungsreihe sind in Tabelle 2 wiedergegeben und in der Figur 3 graphisch veranschaulicht. Die Amplifizierungsreaktion wurde ausgehend von jeweils 150 Kopien pHBV-9 und 50 Kopien von HBV + 12 und unterschiedlichen Mengen an pHBV-wt (400, 200, 100, 50 und 0 Kopien) durchgeführt. Jeder Ansatz wurde vierfach gemessen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

LANE	CODE	A-9	A-WT	A+12	copies-9	copies-12	COPIES 1	COPIES 2	AVERAGE	RESULTS	A-12/A-15
lane 1	400Kp	15000	26877	3932	150	50	420,0	883,5	551,8		3,0
lane 2	400Kp	19198	13730	4481	150	50	361,2	307,6	334,5		4,9
lane 3	400Kp	11405	31862	9888	150	50	286,7	327,4	307,0		2,6
lane 4	400Kp	33124	22759	11270	150	50	232,8	201,9	217,3		3,4
lane 5	200Kp	29358	17841	12476	150	50	170,7	143,0	180,9		2,8
lane 6	200Kp	29044	15523	8900	150	50	250,4	223,0	230,7		2,4
lane 7	200Kp	18598	19323	8380	150	50	189,3	230,8	209,9		2,7
lane 8	200Kp	30630	15974	12007	150	50	200,0	132,2	170,1		3,7
lane 9	200Kp	23039	5270	6731	150	50	64,8	78,3	71,5		1,9
lane 10	100Kp	24400	7532	5581	150	50	120,4	135,0	127,7		3,6
lane 11	100Kp	18766	18983	11517	150	50	175,2	164,8	170,0		3,4
lane 12	100Kp	32503	10835	8760	150	50	151,8	160,3	156,1		2,8
lane 13	100Kp	21417	4244	8193	150	50	37,3	51,8	44,8		3,2
lane 14	50Kp	34103	735	8094	150	50	0,0	9,1	0,5		4,2
lane 15	50Kp	27636	3006	7203	150	50	82,0	52,0	67,0		3,4
lane 16	50Kp	11702	3591	8570	150	50	37,4	41,9	39,6		1,9
lane 17	50Kp	28810	-1	10199	150	50	0,0	0,0	0,0		3,4
lane 18	K5	33264	-1	5303	150	50	0,0	0,0	0,0		3,3
lane 19	K5	15217	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1		2,9
lane 20	K3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1		
lane 21	K3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1		
lane 22											
lane 23											
lane 24											
lane 25											
lane 26											
lane 27											
lane 28											
lane 29											
lane 30											
lane 31											
lane 32											
lane 33											
lane 34											
lane 35											

Die Ergebnisse zeigen, daß der festgestellte DNA-Gehalt sehr gut reproduzierbar ist.

#### 55 Patentansprüche

1. Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren in einer Probe unter Anwendung von Nukleinsäure-Amplifizierung, wobei der Probe vor dem Amplifizierungsschritt eine gegebene Menge eines bekannten

Nukleinsäuremoleküls als interner Standard zugegeben wird, welches Standard-Nukleinsäuremolekül sich von der zu quantifizierenden Nukleinsäure zumindest in einem detektierbaren Merkmal unterscheidet,

**dadurch gekennzeichnet,**

daß der Probe vor der Nukleinsäure-Amplifizierung bekannte Mengen von mindestens zwei sich zumindest in einem detektierbaren Merkmal voneinander und von der zu quantifizierenden Nukleinsäure unterscheidenden bekannten Nukleinsäuremolekülen als interner Standard zugegeben werden, die erhaltenen Mengen an amplifizierter Proben- und Standard-Nukleinsäure bestimmt werden und aus den erhaltenen Mengen die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an zu quantifizierender Nukleinsäure bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß beim Amplifizieren Primer mit fluoreszierenden oder radioaktiven Gruppen oder chemischen Gruppen, die mit affinen Proteinen und nachgeschalteten Detektionsreaktionen detektiert werden können, vorzugsweise mit fluoreszierenden Gruppen, verwendet werden.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Amplifizierung der Nukleinsäuren bereits in der exponentiellen Phase gestoppt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bestimmung der Mengen an amplifizierter Nukleinsäure unter Verwendung eines Nukleinsäure-Detektionsgerätes, vorzugsweise eines fluoreszenz-empfindlichen Nukleinsäure-Detektionsgerätes, erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß virale Nukleinsäuren, vorzugsweise HIV-, Parvovirus-, Herpesvirus-, HAV-, HBV-, HCV-, Baculovirus-, Adenovirus- oder Vacciniavirus-Nukleinsäuren, quantifiziert werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß virale Nukleinsäuren in einer biologischen Probe, insbesondere Blut- und Blutderivaten und biotechnologischen Produkten, quantifiziert werden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß unterschiedliche Mengen der Standard-Nukleinsäuren der Probe vor der Amplifizierung zugegeben werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß Standard-Nukleinsäuren zum Einsatz kommen, welche eine gegenüber der zu quantifizierenden Nukleinsäure unterschiedliche Länge aufweisen, vorzugsweise eine Standard-Nukleinsäuresequenz, welche kürzer, und eine Standard-Nukleinsäuresequenz, welche länger ist als die zu quantifizierende Nukleinsäure.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß mehrere erhaltene Mengen an amplifizierter Proben- und Standard-Nukleinsäure in der gleichen Probe mittels der Multiplex-Analyse bestimmt werden.

10. Verfahren zur Bestimmung der Nachweisgrenze von bestimmten Nukleinsäuren unter Verwendung eines Verfahrens gemäß der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine Standard-Nukleinsäure mit einer Konzentration von knapp oberhalb der Nachweisgrenze eingesetzt wird.

11. Biologische, insbesondere biotechnologische Produkte, die zumindest einen Gehalt an Nukleinsäure unterhalb der Grenze von 10 bzw 100 pg pro Dosis, ermittelt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, aufweisen und daher im wesentlichen frei von Nukleinsäuren sind.

12. Biologische, insbesondere biotechnologische Produkte nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie ausgewählt sind aus viralen Proteinen, insbesondere gp160, rekombinanten Blutfaktoren, Plasmaproteinen sowie Impfstoffen, insbesondere gegen Herpes-, Influenza- oder TBE-Viren, und monoklonalen Antikörpern

13. Verwendung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Detektion von Nukleinsäuren in biologischen Proben.

14. Primer mit der Sequenz gemäß der Seq.ID 3, 4, 5, 6, 7 und 8.

15. Standard-Plasmide pgag1, pgag-15, pgag + 12, pHAV-wt, pHAV-10bp, pHAV + 9bp, pHCV-wt, pHCV-7bp, pHCV + 8bp, pHBV-wt, pHBV-9bp und pHBV + 12bp.

5

Hiezu 12 Blatt Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

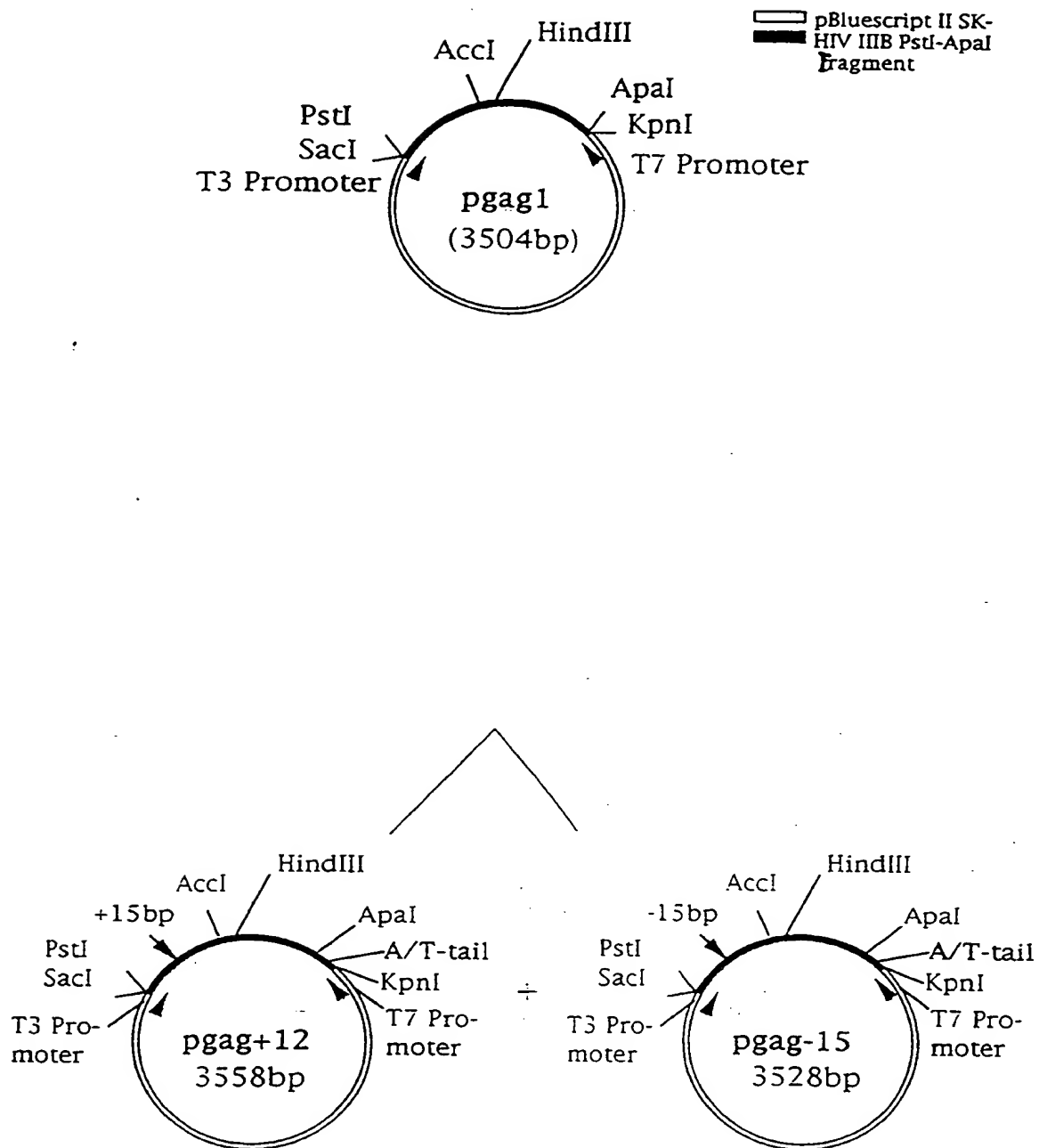


Fig. 1



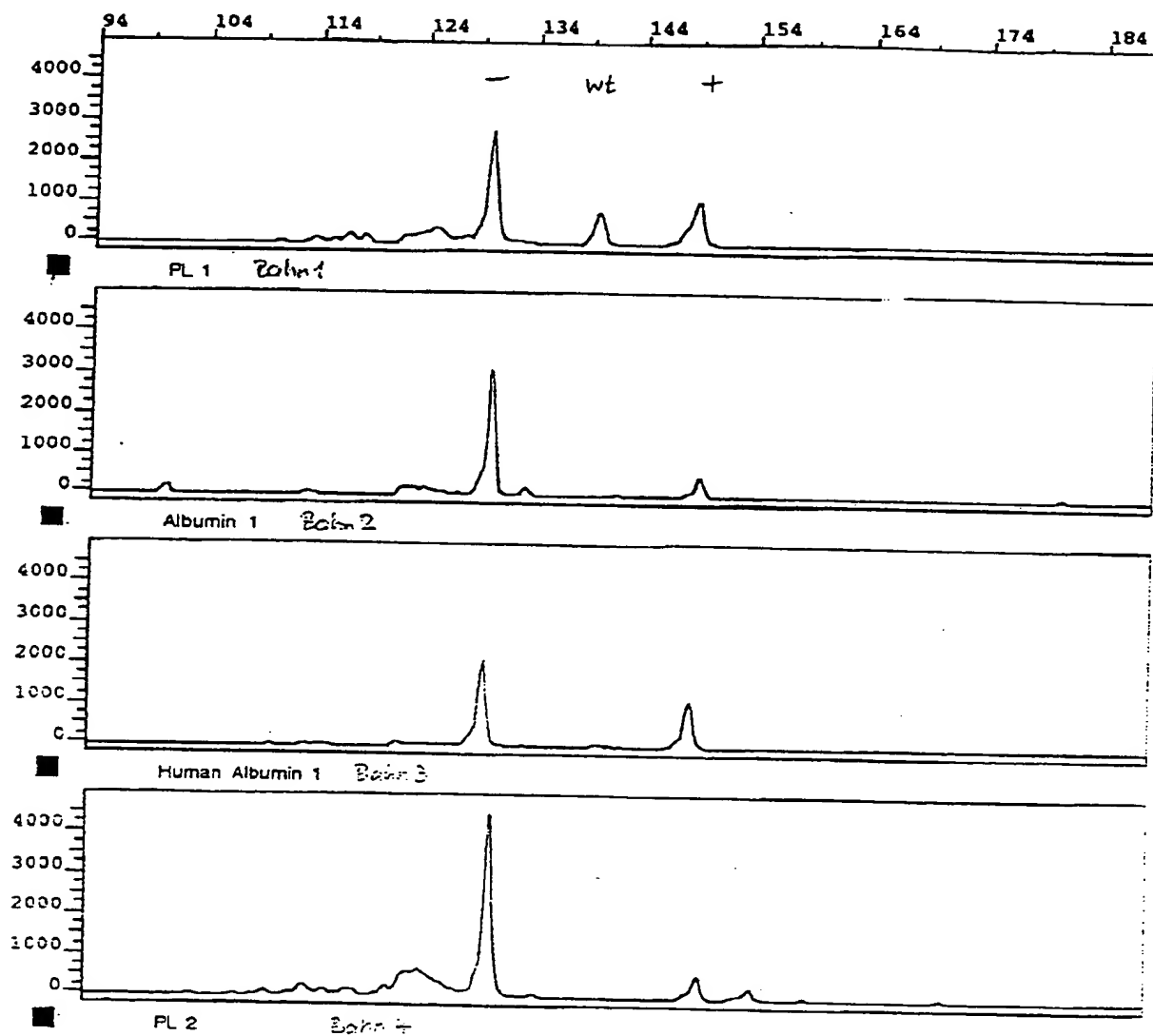


Fig. 2-A

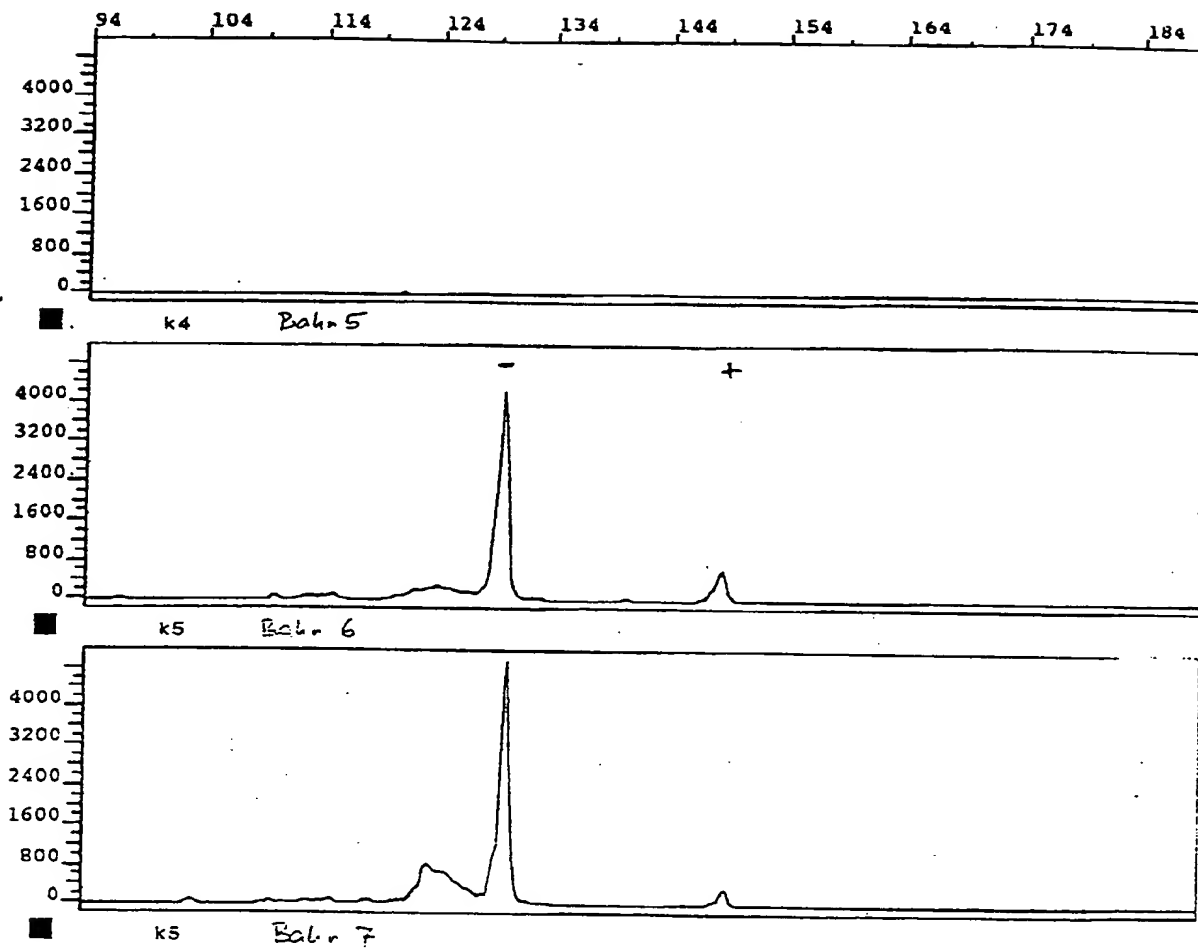


Fig. 2-B

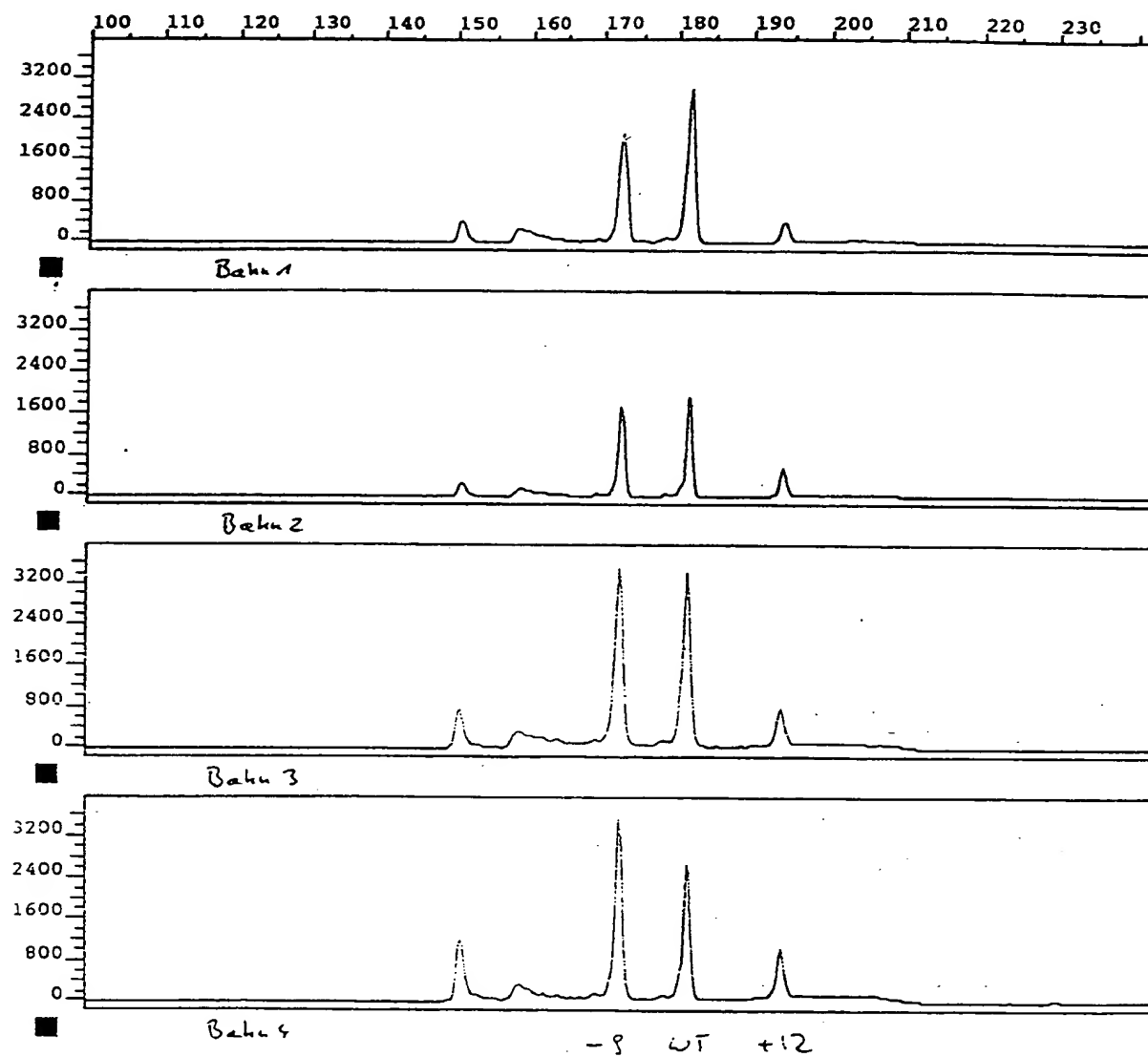


Fig.3-A

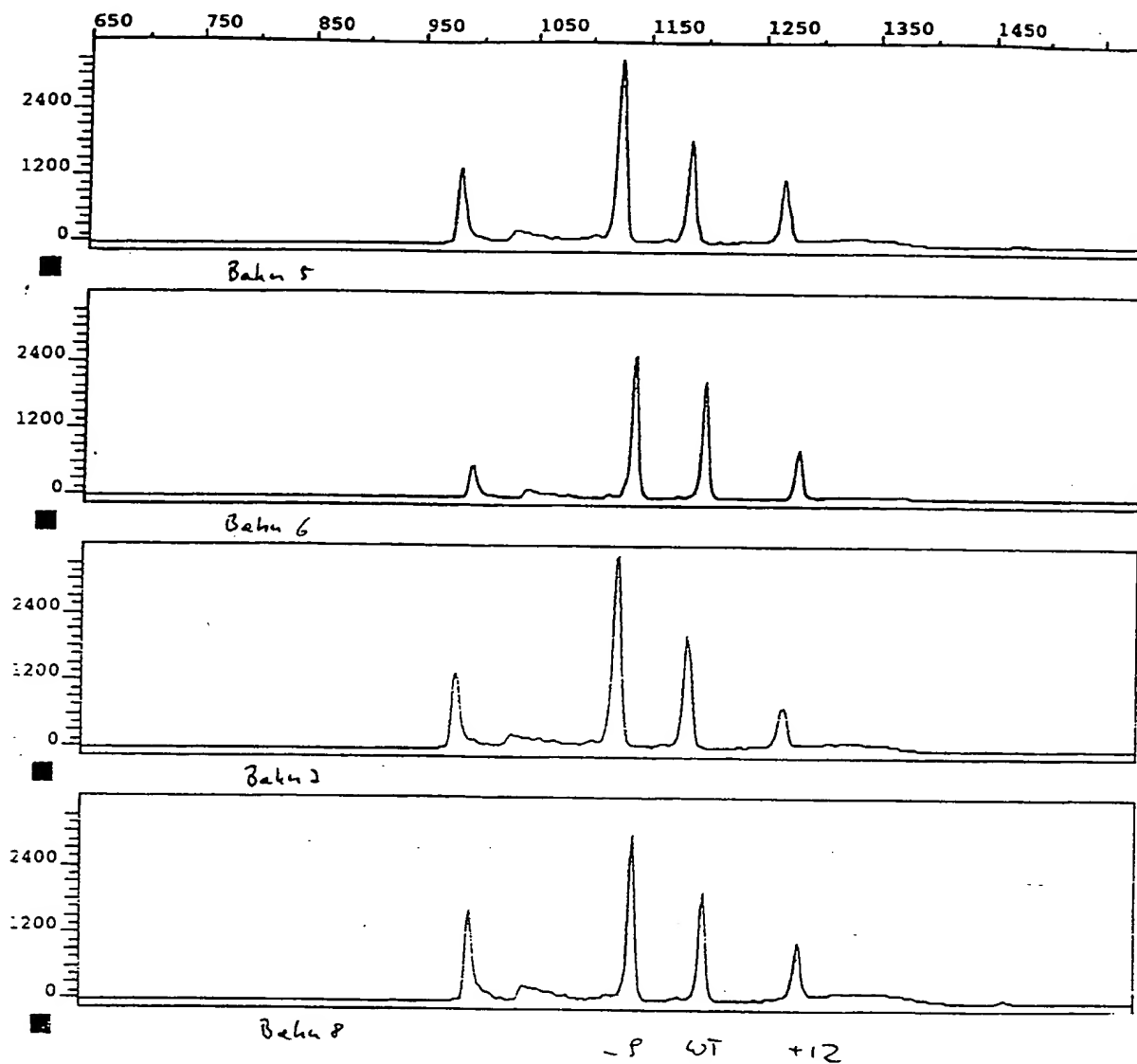


Fig.3-B

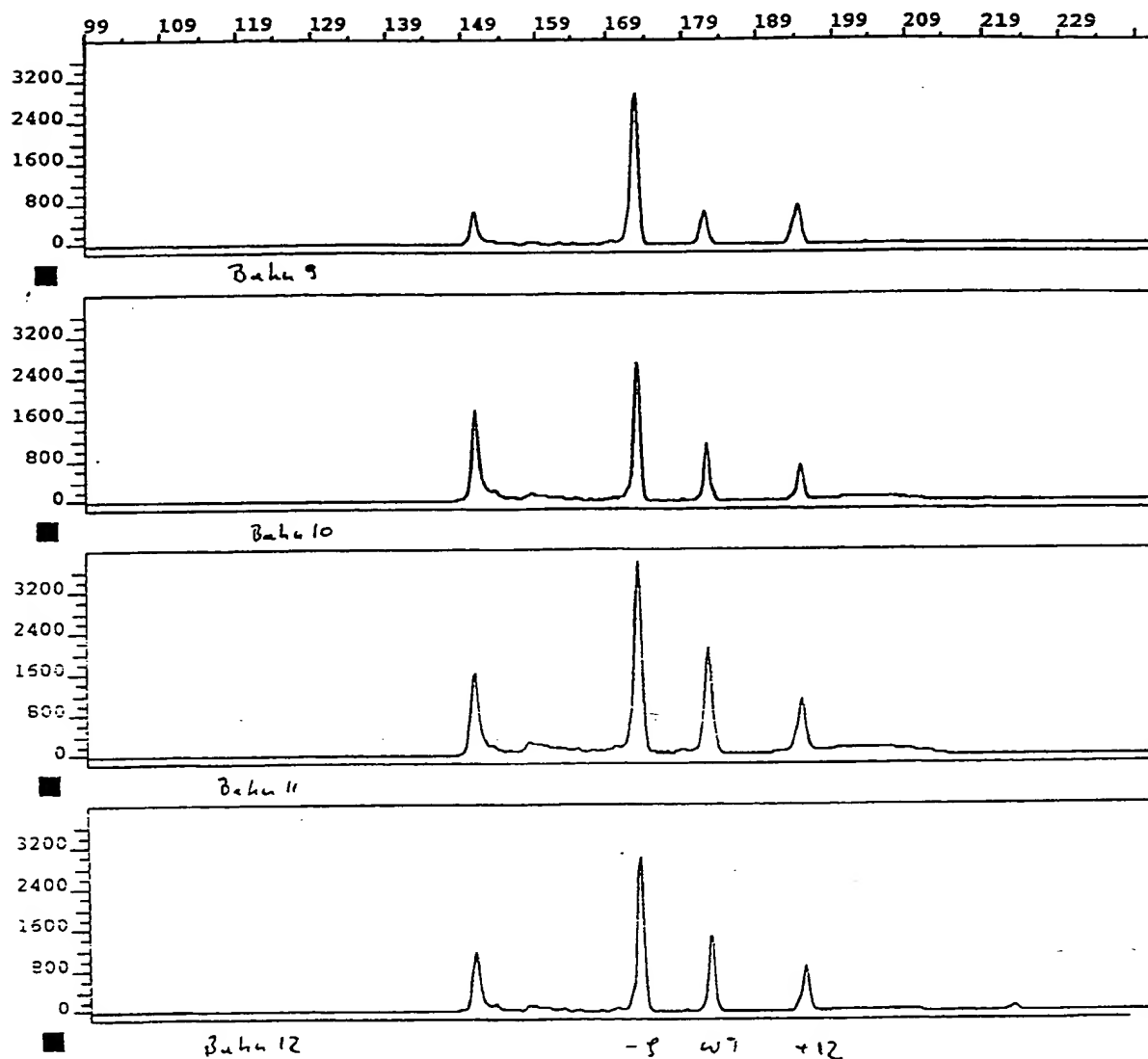


Fig.3-C

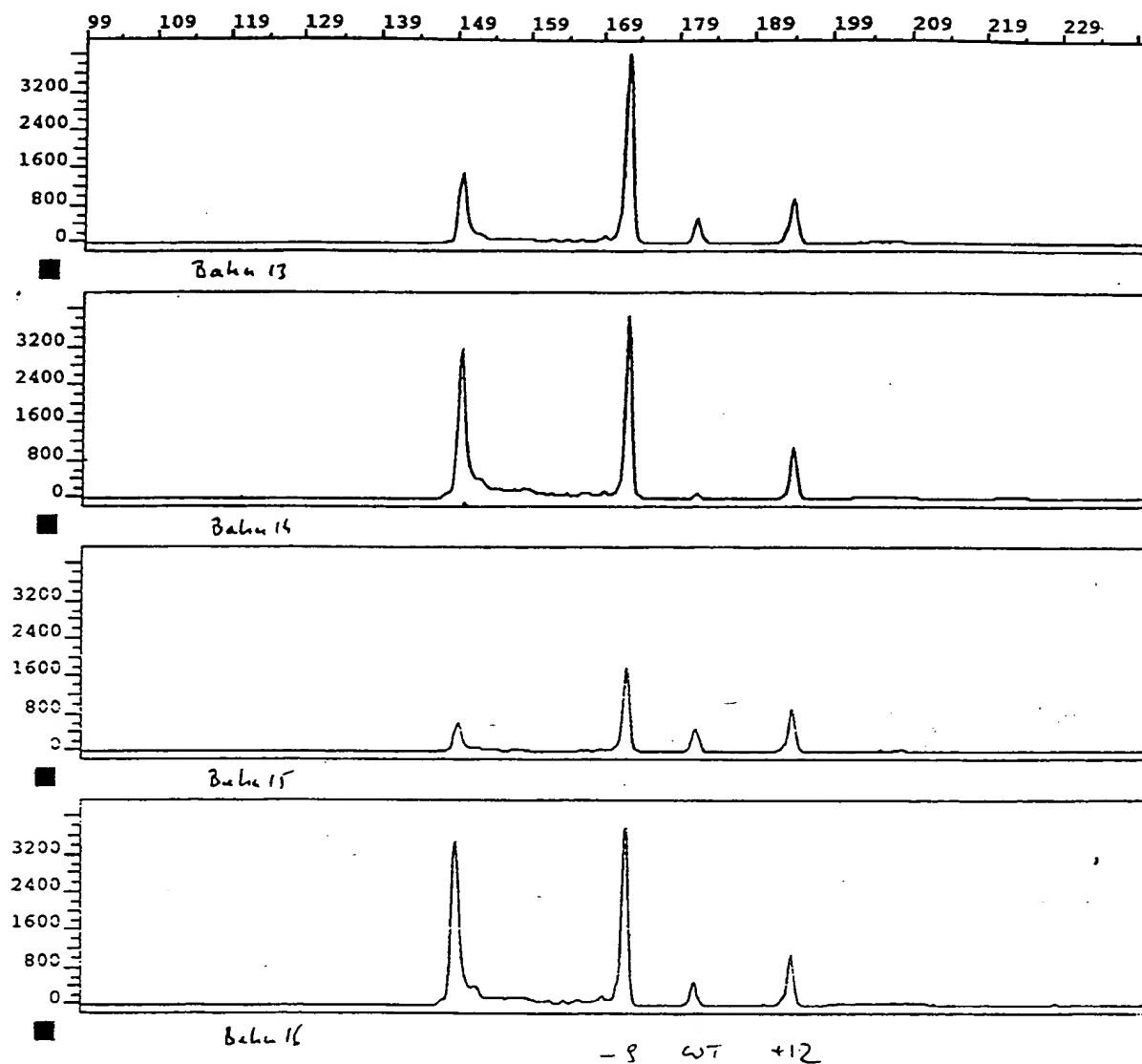


Fig.3-D

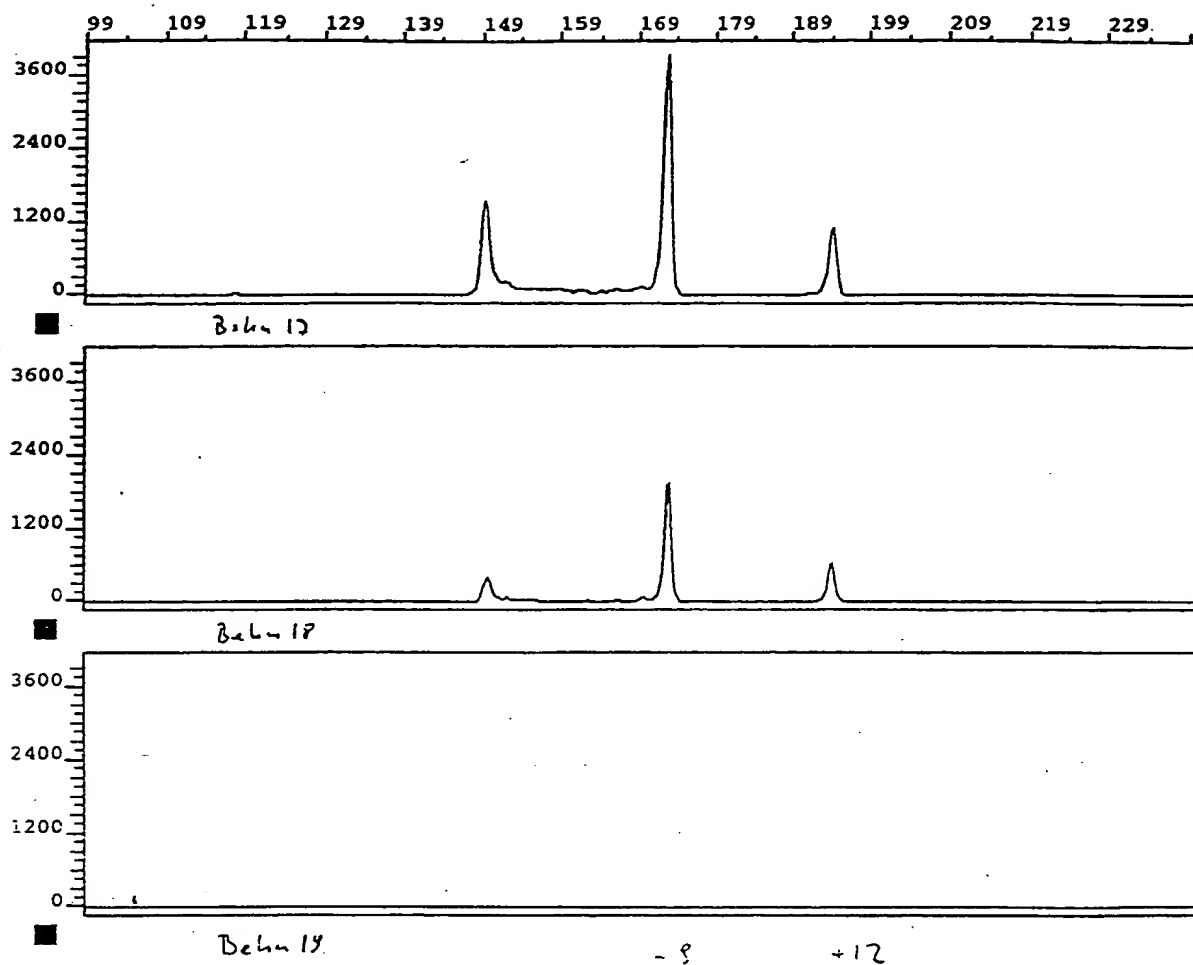


Fig.3-E



## SEQUENZPROTOKOLL

### INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

#### (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

#### (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

#### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATAATCCACC TATCCAGTA GGAGAAAT

28

### INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

#### (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

#### (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

#### (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TTTGGTCCTT GTCITATGTC CAGAATGC

28

Fig. 4-A

INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ACTGCCATTG GGAAGCTTAT TGTG

24

INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CATCCATAGC ATGATAAAGA GGAGC

25

Fig. 4-B

INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CTGTGAGGAA CTACTGTCTT

20

INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CGGTTCCGCA GACCACTATG

20

Fig. 4-C

INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CATTGATCCT TATAAAGAAT TTGGAGC

27

INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (synthetisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CCAGCAGAGA ATTGCTTGCC TGAG

24

Fig. 4-D